



FR 04 102257	
REC'D 26 NOV 2004	
WIPO	PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 SEP. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • B / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 4 SEPT 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0310470 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 4 SEP. 2003		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 36, rue de St-Pétersbourg 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPbv644/112			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE LA PROTEINE Pks 13 CODANT POUR LA CODENSASE DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	3, rue Michel Ange	
	Code postal et ville	17 5 0 1 6 PARIS	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES
DATE **4 SEPT 2003**
LIEU **75 INPI PARIS**
N° D'ENREGISTREMENT **0310470**
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		Nom		VIALLE-PRESLES
		Prénom		Marie José
		Cabinet ou Société		CABINET ORES
		N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36, rue de St-Petersbourg		
	Code postal et ville	17 5 10 10 18 PARIS		
	Pays	FRANCE		
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00		
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88		
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com		
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé		
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



Réservé à l'INPI	
REMISE DES PIÈCES	4 SEPT 2003
DATE	75 INPI PARIS
LIEU	0310470
N° D'ENREGISTREMENT	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/112																															
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N° Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N° Pays ou organisation Date <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> N°																															
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique																															
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE PARIS SUD XI																															
Prénoms																																	
Forme juridique		Etablissement public																															
N° SIREN		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Code APE-NAF		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Domicile ou siège	Rue	15 rue Georges Clémenceau																															
	Code postal et ville	91140 ORSAY Cedex																															
	Pays																																
Nationalité																																	
N° de téléphone (facultatif)																																	
N° de télécopie (facultatif)																																	
Adresse électronique (facultatif)																																	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique																															
Nom ou dénomination sociale																																	
Prénoms																																	
Forme juridique																																	
N° SIREN		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Code APE-NAF		<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Domicile ou siège	Rue																																
	Code postal et ville	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																															
Pays																																	
Nationalité																																	
N° de téléphone (facultatif)																																	
N° de télécopie (facultatif)																																	
Adresse électronique (facultatif)																																	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI																															
VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)																																	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention est relative à une nouvelle enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques, et à son utilisation pour le criblage d'antibiotiques, notamment d'anti-mycobactériens.

Les acides mycoliques sont des acides gras à longue chaîne, α -alkylés et β -hydroxylés, présents sous forme d'esters dans les parois cellulaires de bactéries d'une lignée phylogénétique particulière des actinomycètes, le sous-ordre des *Corynebacterineae*, également dénommés «mycolatas», comprenant les genres bactériens : *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordona* et *Tsukamurella*.

Parmi les mycolatas, on trouve des pathogènes majeurs, notamment les mycobactéries *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose, et *Mycobacterium leprae*, agent de la lèpre.

Depuis une quinzaine d'années, on observe une recrudescence de la tuberculose, notamment dans les pays industrialisés. Ce phénomène est en partie lié à l'apparition de souches du bacille tuberculeux résistantes aux antibiotiques existants. Ainsi, la conception de nouveaux médicaments antituberculeux est redevenue une priorité importante.

Parmi les médicaments anti-tuberculeux les plus efficaces, se trouvent ceux qui interfèrent avec la biosynthèse de l'enveloppe des mycobactéries, tels que l'isoniazide, l'éthionamide et l'ethambutol (WEBB et al., Molecular Biology and Virulence 1 : 287-307 (eds. Ratledge, C. & Dale, J.) (Blackwell Science Ltd, Oxford), 1999). Les acides mycoliques représentent un constituant majeur de cette enveloppe. Il a été rapporté qu'ils intervenaient dans des fonctions biologiques importantes, participant notamment à la

Annu. Rev. Biochem. 64 : 29-63, 1995 ; DAFE et DRAPER, Adv. Microb. Physiol. 39 : 131-203, 1998).

Les chaînes α et β des acides mycoliques varient en longueur et en structure (Figure 1A), mais présentent un motif commun (motif mycolique : $-\text{CHOH}-\text{CHR}_2-\text{COOH}$), ce qui suggère qu'une étape enzymatique impliquée dans la formation de ce motif est commune à toutes les mycolatas.

Selon un modèle généralement accepté actuellement (GASTAMBIDE-ODIER et al., Biochemische Zeitschrift 333 : 285-295, 1960), les dernières étapes de la biosynthèse des acides mycoliques consisteraient en une cascade de réactions (Figure 1B) : (1) activation de l'acyl pour former une molécule d'acyl-CoA catalysée par une acyl-CoA synthase ; (2) carboxylation d'une molécule d'acyl-CoA pour former une molécule d'acylmalonyl-CoA catalysée par une acyl-CoA carboxylase ; (3) condensation de type Claisen d'une molécule d'acyl-CoA et d'une molécule d'acylmalonyl-CoA pour former l'intermédiaire β -ceto acyl, catalysée par une condensase ; (4) réduction de l'intermédiaire β -ceto acyl pour former l'acide mycolique catalysée par une réductase.

Le motif mycolique serait probablement formé lors de la réaction de condensation de type Claisen. Toutefois, jusqu'à présent l'enzyme responsable de cette condensation n'avait pas été identifiée.

Cette réaction de condensation apparaît similaire à la condensation d'acyl-CoA avec le méthylmalonyl-CoA qui intervient dans la formation d'acides gras ramifiés polyméthylés chez les mycobactéries (MATHUR et al., J. Biol. Chem. 267 : 19388-19395, 1996 ; SIRAKOVA et al., J. Biol. Chem. 276 : 16833-16839, 2001 ; DUBEY et al., Mol. Microbiol. 45: 1451-1459, 2000), où elle est catalysée par des polykétides synthases (Pks) de type I.

Les Inventeurs ont émis l'hypothèse que la réaction de condensation conduisant aux acides mycoliques chez les mycolatas pourrait être catalysée par une Pks de type I ayant une spécificité de substrat inhabituelle.

Pour vérifier cette hypothèse, ils ont d'abord recherché, à partir de séquences de mycolatas présentes dans

les bases de données, s'il existait une Pks commune à ces bactéries et comprenant les domaines fonctionnels nécessaires à la réaction de condensation, à savoir : un domaine acyl transférase (AT), un domaine kétosynthase (KS), un domaine « acyl carrier protein » (ACP), et un domaine thioestérase (TE).

Ils ont ainsi identifié chez *M. tuberculosis*, un gène dénommé *pks13* codant pour une Pks de type I, ainsi que des orthologues de ce gène chez les autres mycobactéries, ainsi que chez les corynébactéries. Ces protéines possèdent de fortes similarités de séquence (70 à 80% d'identité sur toute la longueur de la protéine pour les différentes Pks13 mycobactériennes et 40 à 50% d'identité entre Pks13 de *M. tuberculosis* et Pks13 de *C. glutamicum* ou *C. diphtheriae*), et possèdent en outre les domaines, mentionnés ci-dessus, qui sont nécessaires à la réaction de condensation et au relargage du produit.

Ces protéines seront donc désignées ci-après sous le terme général « Pks13 »

Les Inventeurs ont en outre montré que l'inactivation du gène codant pour Pks13 conduisait au blocage de la synthèse des acides mycoliques, et à une perte de la viabilité bactérienne.

En outre, ils ont produit et purifié la protéine Pks13 sous forme recombinante.

Les résultats obtenus par les Inventeurs montrent que Pks13 est la condensase intervenant dans la synthèse des acides mycoliques, et qu'il s'agit d'une enzyme clé dans l'assemblage de l'enveloppe des mycolatas, et essentielle pour la viabilité des mycobactéries.

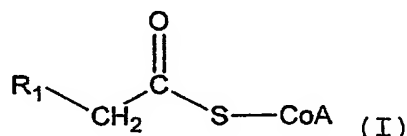
La présente invention a pour objet une protéine purifiée, dénommée Pks13, impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques.

b) elle possède un domaine acyl transférase (pfam00698), un domaine kétoacylsynthase (pfam02801 ou pfam00109), au moins un domaine acyl carrier protein (COG0331 ou COG0304,), et un domaine thioestérase (COG3319 ou pfam00975)

- 5 c) elle catalyse une condensation de Claisen entre une molécule d'acyl-CoA et une molécule d'acylmalonyl-CoA.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite protéine Pks13 catalyse une condensation de Claisen entre :

- 10 a) une molécule d'acyl-CoA de formule I :

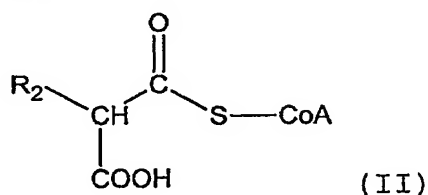


dans laquelle R1 est une chaîne comprenant de 6 à 68 atomes de carbone, pouvant contenir une ou plusieurs doubles liaisons ---C=C--- , et/ou un ou plusieurs cycles *cis/trans*-

- 15 cyclopropane, et/ou un ou plusieurs groupes $\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{---O---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}\text{---}$ et/ou pouvant porter un ou plusieurs groupes latéraux choisis parmi ---CH_3 , =O , ---O---CH_3 ;

et

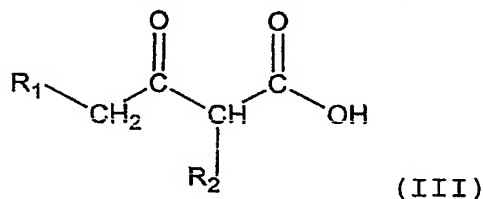
- b) une molécule d'acylmalonyl-CoA de formule II :



20

dans laquelle R2 est un alcane linéaire comprenant de 10 à 24 atomes de carbone ;

pour former un intermédiaire β -ceto acyl de formule III :



- 25 dans laquelle R1 et R2 sont tels que définis ci-dessus.

Des dispositions particulières de ce mode de réalisation sont les suivantes :

- 5 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 6-16 atomes de carbone et R2 comprend de 12 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Corynebacterium* ;
- 10 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 28-48 atomes de carbone et R2 comprend de 14 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Gordona* ;
- 15 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 42 à 68 atomes de carbone et R2 comprend de 18 à 24 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Mycobacterium* ;
- 20 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 24 à 46 atomes de carbone et R2 comprend de 10 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Nocardia* ;
- 25 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 14 à 34 atomes de carbone et R2 comprend de 10 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Rhodococcus* ;
- 30 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 10 à 56 atomes de carbone et R2 comprend de 16 à 20 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Mycobacterium* ;

70% d'identité avec la protéine Pks13 de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 1).

Selon encore un autre mode de réalisation de la présente invention, ladite protéine Pks13 possède au moins
5 50% d'identité, de préférence au moins 60%, et de manière tout à fait préférée au moins 70% d'identité avec la protéine Pks13 de *Corynebacterium glutamicum* (SEQ ID NO: 2).

La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression, comprenant une séquence
10 polynucléotidique codant pour une protéine Pks13 conforme à l'invention, ainsi qu'une cellule-hôte, procaryote ou eucaryote, transformée par ledit vecteur d'expression.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'une protéine Pks13 conforme à
15 l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule-hôte conforme à l'invention, et la purification de la protéine Pks13 à partir de ladite culture.

La présente invention a également pour objet un procédé pour inhiber la biosynthèse de l'enveloppe des
20 mycolatas caractérisé en ce qu'il comprend l'inhibition de l'expression ou de l'activité de la protéine Pks13 chez lesdites bactéries.

Du fait de son caractère essentiel pour la viabilité, et de sa spécificité d'action, la condensase Pks13
25 constitue une excellente cible potentielle pour la conception de nouveaux médicaments, notamment de nouveaux antituberculeux.

La présente invention a en conséquence pour objet l'utilisation d'une condensase Pks13 conforme à l'invention,
30 pour le criblage d'antibiotiques actifs sur les mycolatas, et notamment sur les mycobactéries.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples illustrant l'identification, la
35 production, et la purification de la condensase Pks13, ainsi que les effets de son inactivation sur la viabilité des mycolatas.

EXEMPLE 1 : IDENTIFICATION DE LA CONDENSASE PKS13

M. tuberculosis contient 16 Pks de type I parmi lesquelles 9 se retrouvent également chez *M. leprae*. Parmi ces 9 enzymes putatives, 7 sont déjà connues pour leur implication dans la biosynthèse d'autres groupes de lipides chez *M. tuberculosis* (AZAD et al., J. Biol. Chem. 272 : 16741-16745, 1997 ; CONSTANT et al., J. Biol. Chem. 277 : 38148-38158, 2002). Parmi les deux protéines candidates restantes, celle dénommée ML1229 présente la même organisation de domaine ainsi que de fortes similarités de séquences avec les Pks de type I de *M. tuberculosis* impliquées dans la biosynthèse des acides gras polyméthyl ramifiés. Le second candidat est dénommé Pks13 dans *M. tuberculosis* et ML0101 dans *M. leprae*.

L'analyse de la séquence déduite de Pks13 (Numéro d'accension NP_338459 ; 1733 acides aminés) de *M. tuberculosis* CDC1551 révèle la présence des différents domaines catalytiques nécessaires et suffisants pour la catalyse de la condensation de type Claisen intervenant dans la formation des acides mycoliques : deux domaines « Acyl carrier protein » (ACP) (acides aminés 39 à 107 et 1237 à 1287), un domaine « kétosynthase » (KS) (acides aminés 119 à 543), un domaine « acyl transférase » (AT) (acides aminés 640 à 1045), et un domaine « thioestérase » (TE) (acides aminés 1464 à 1543).

Des orthologues de ML1229 et Pks13 ont été recherchés chez différentes espèces en utilisant le programme BLAST (ALTSCHUL et al., Nucleic Acid Res. 25 : 3389-3402, 1997). Les séquences de différentes condensases putatives Pks13 codées par le gène *pks13*, « acyl-CoA synthase » FadD32 et « sous-unité de l'acyl-CoA carboxylase » AccD4 (codées respectivement par deux gènes *fadD32* et *accD4* flanquant le

Aucun orthologue de ML1229 n'a été identifié chez trois espèces de corynébactéries (*C. glutamicum*, *C. efficiens* et *C. diphteriae*) alors que des orthologues de Pks13 (ML0101) ont été retrouvés chez les trois espèces de corynébactéries susmentionnées et chez trois autres espèces de mycobactéries (*M. smegmatis*, *M. marinum* et *M. avium*). Ces protéines Pks13 contiennent les domaines catalytiques requis pour la condensation conduisant à la synthèse de l'acide mycolique, et les gènes correspondants sont localisés en aval de gènes connus pour leur implication dans le transfert de l'acide mycolique sur l'arabinogalactane (PUECH et al., Mol. Microbiol. 44 : 1109-1122, 2002). Les identités des séquences des protéines Pks13 par rapport à la séquence complète de la Pks13 de *M. tuberculosis* sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1

	<i>M. leprae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. avium</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>C. efficiens</i>	<i>C. diphteriae</i>
<i>M. tuberculosis</i>							
FadD32	93%	75%	93%	83%	40%	42%	42%
Pks13	83%	71%	84%	81%	44%	43%	44%
AccD4	91%	81%	85%	80%	54%	52%	53%

La présence de Pks13 a également été mise en évidence dans d'autres espèces bactériennes produisant des acides mycoliques, en amplifiant par PCR un fragment interne de 1 kb de *pks13* à partir du génome de *Nocardia asteroides* ATCC19243, *Rhodococcus rhodochrous* ATCC13808 et *Tsukamurella paurometabolum* CIP100753T, en utilisant les amorces dégénérées suivantes :

pks13a : 5'-GCTGGARCTVACVTGGGARGC-3' (SEQ ID NO : 3)

25 pks13b : 5'-GTGSGCGTTGGYDCCRAAVCCGAA-3' (SEQ ID NO : 4)

Les conditions de PCR sont : 2,5 unités de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me₂SO), 1 mM de dNTP et 4 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées

par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 58°C, 1 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C. Pour *T. paurometabolum*, les étapes à 58°C sont remplacées par des étapes à 50°C.

Les séquences de ces fragments présentent 40% d'identité sur toute leur longueur avec la Pks13 de *M. tuberculosis*, suggérant également la présence de *pks13* chez ces bactéries.

L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine Pks13 est retrouvée chez toutes les mycolatas produisant des acides mycoliques, et que parmi les Pks de type I, elle est la seule enzyme susceptible de catalyser la condensation des chaînes α et β d'acides gras pour former les acides mycoliques.

EXEMPLE 2 : CLONAGE, SUREXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES PKS13 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ET CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM

Construction des plasmides

La souche de *C. glutamicum* ATCC13032 (DUSCH et al., Appl. Environ. Microbiol. 65 : 1530-1539, 1999) est mise en culture sur un milieu BHI (DIFCO). La souche de *M. tuberculosis* H37Rv est mise en culture sur un milieu liquide Middlebrook 7H9 (DIFCO) additionné de 10% ADC (DIFCO) et de 0,05% Tween 80.

Les milieux de culture sont additionnés de kanamycine, d'hygromycine, de chloramphénicol et de sucrose quand nécessaire à une concentration finale de 40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$ et 10% (p/v), respectivement.

L'ADN bactérien total est extrait à partir de 5 ml de cultures liquides saturées comme décrit dans BELLILE

13Rtb 5'-GAGGACATATGGCTGACGTAGCGGAATC-3' (SEQ ID NO : 5) et
 13Stb 5'-CGGTGAAAGCTTCTGCTTGCTTACCTCACTTG-3' (SEQ ID NO : 6),
 avec 2,5 unités d'ADN polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France),
 10% de diméthyl sulfoxyde (Me₂SO), et 1 µM de chaque amorce
 5 dans un volume final de 50 µl, dans les conditions
 recommandées par le fournisseur (PROMEGA, Lyon, France). Le
 programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles
 de 1 min à 94°C, 1 min à 57°C, 5 min à 72°C, puis 10 min à
 72°C. Le produit d'amplification est purifié en utilisant le
 10 kit Qiaquick (QIAGEN, Courtaboeuf, France), puis digéré avec
 les enzymes de restriction *NdeI/HindIII*. Le fragment obtenu
 est inséré dans le vecteur pET26b (NOVAGEN), lui-même coupé
 avec les enzymes de restriction *NdeI/HindIII*. Le plasmide
 résultant, dénommé pWM35, contient le gène *pks13* fusionné en
 15 3' du gène à une étiquette formée de 18 nucléotides codant
 pour une séquence de 6 histidines.

Le gène *pks13* de *M. tuberculosis* est amplifié par
 PCR à partir de l'ADN total de la souche H37Rv et des amorces
 13Rtb 5'-GAGGACATATGGCTGACGTAGCGGAATC-3' (SEQ ID NO : 5) et
 20 13Ttb 5'-GCTCGGGGATCCTCACTGCTTGCTTACCTCAC-3' (SEQ ID NO : 7),
 dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le
 produit d'amplification est purifié comme décrit ci-dessus
 puis digéré avec les enzymes de restriction *NdeI/BamHI*. Le
 fragment obtenu est inséré dans le vecteur pET15b (NOVAGEN)
 25 préalablement coupé avec les enzymes de restriction
NdeI/BamHI. Le plasmide résultant, pWM36, possède le gène
pks13 fusionné en 5' du gène à une étiquette de 18
 nucléotides codant pour une séquence de 6 histidines.

Plasmide pWM38

30 Le gène *pks13* de *C. glutamicum* ATCC13032 est
 amplifié par PCR à partir de l'ADN total de cette souche et
 des amorces 13Ccg 5'-AATATGACTAGTAGCCAATCGTCGGATCAGAAG-3'
 (SEQ ID NO : 8) et 13Dcg 5'-
 AGCTCTAGATCTCTAATTCTTCCGAGAAATCTCAT-3' (SEQ ID NO : 9), dans
 35 les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le
 produit d'amplification est purifié comme précédemment puis
 digéré avec les enzymes de restriction *SpeI/BglIII*. Le

fragment obtenu est inséré dans le vecteur pET15b modifié par insertion d'un site *SpeI* à la place du site *XhoI*, puis coupé avec les enzymes de restriction *SpeI/BamHI*. Le plasmide résultant, pWM38, possède le gène *pks13* de *C. glutamicum* fusionné à une étiquette de 18 nucléotides en 5' du gène codant pour une séquence de 6 histidines.

Surexpression des protéines Pks13 de *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium glutamicum* chez *Escherichia coli*

Les plasmides pWM35, pWM36 et pWM38 sont transférés dans la souche d'*Escherichia coli* BL21 (DE3):pLysS (NOVAGEN).

Les trois souches sont inoculées dans 3 ml de milieu LB contenant du chloramphénicol (30 µg/ml) et de la kanamycine (40 µg/ml) ou de l'ampicilline (100 µg/ml) en fonction des plasmides. Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation (250 tr/min) jusqu'à saturation.

Une dilution au 1/100^{ème} de ces cultures est réalisée dans 200 ml de milieu LB contenant de la kanamycine ou de l'ampicilline. Ces nouvelles cultures sont incubées sous agitation à 37°C pendant 2h30 ($DO_{600nm} = 0,7-0,8$). De l'isopropyl-thio-β-D-galactoside (IPTG) est ajouté à une concentration finale de 0,5 mM et la culture est incubée 3h à 30°C sous agitation.

Purification des protéines Pks13 de *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium glutamicum*

Les cellules exprimant les différentes protéines Pks13 sont culottées par centrifugation à 2500 g pendant 15 min, puis reprises dans 40 ml de tampon de charge (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, Imidazole 5 mM, NaCl 300 mM). Les cellules sont congelées à -20°C pendant 15h, puis elles subissent 2 cycles de lyse par sonication à 4°C pendant 1 minute.

« Chelating Sepharose Fast Flow » (AMERSHAM) en FPLC (BIORAD HP duoflow). La protéine est éluée par gradient de 5 à 150 mM d'Imidazole avec un pic d'éluion à 90 mM. Les fractions enrichies en protéines sont mélangées, concentrées par filtration sur centripep 30 (AMICON), et la protéine est séparée des contaminants résiduels par chromatographie d'exclusion (S-200 16/60 mm, AMERSHAM) en FPLC.

En suivant cette procédure, environ 20 mg de protéines Pks13 de *M. tuberculosis* ou de *C. glutamicum* sont obtenus.

EXEMPLE 3 : ANALYSE BIOCHIMIQUE DE MUTANTS $\Delta pks13$ DE *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* ET *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*

La souche de *C. glutamicum* ATCC13032 est mise en culture comme précédemment décrit.

La souche de *M. smegmatis* mc²155 de type sauvage (SNAPPER et al., Mol. Microbiol. 4 : 1911-1919, 1990) est mise en culture sur un milieu LB (DIFCO) supplémenté par 0,05% de Tween 80 afin d'éviter l'agrégation.

Les milieux de culture sont additionnés de kanamycine, d'hygromycine, de chloramphénicol et de sucrose quand nécessaire à une concentration finale de 40 µg/ml, 50 µg/ml, 15 µg/ml et 10% (p/v), respectivement.

L'ADN bactérien total est extrait à partir de 5 ml de culture liquide saturée comme décrit dans BELISLE et al., 1998. Le culots d'ADN est re-suspendu dans 100 µl de Tris 10 mM (pH 8).

Construction d'un mutant de *C. glutamicum*

Souche mutante $\Delta pks13$ de *C. glutamicum*

Deux fragments d'ADN de 0,9 kb et 0,7 kb chevauchant le gène *pks13* sur ses extrémité 5' et 3' sont amplifiés par PCR à partir de l'ADN total de *C. glutamicum* en utilisant respectivement les couples d'amorces suivants :

pkdel5 : 5'-GAAATCTCGAGCCACGGCGAAA-3' (Tm=54°C)
(SEQ ID NO : 10)

pkdel2 : 5'-ACGATTGCCGCGGTTCCATATTG-3' (Tm=54°C)
(SEQ ID NO : 11)

et

pkdel13: 5'-CATCCTGTTCCGCGGAACGCATGC-3' (Tm=54°C)
(SEQ ID NO : 12)

pkdel14: 5'-CAGCATGATGGAGATCTGAGGGC-3' (Tm=54°C)
(SEQ ID NO : 13)

5 Les conditions de PCR sont : 1 unité de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP et 0,5 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification
10 est : 2 min à 94°C, puis 35 cycles de 1 min à 94°C, 30 sec à 54°C, 1 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C.

Ces fragments sont insérés dans le plasmide pMCS5 (MOBITEC, Göttingen, Allemagne). Une cassette de résistance à la kanamycine est insérée entre ces deux fragments PCR pour
15 donner le plasmide pCMS5::pks. Ce plasmide est transféré dans la souche *C. glutamicum* et les transformants sont sélectionnés sur un milieu gélosé contenant de la kanamycine.

La Figure 3A présente schématiquement la structure génétique du locus *pks13* dans la souche de type sauvage (WT) et dans la souche mutante $\Delta pks13$ de *C. glutamicum*. Dans cette dernière, l'allèle de type sauvage de *pks13* présent sur le chromosome est remplacé par un allèle muté contenant une délétion interne de 4,3 kb dans laquelle le gène *km* codant pour la kanamycine est inséré. Les boîtes
20 indiquent les différents gènes du locus *pks13*. La localisation et le nom des amorces utilisées pour l'analyse par PCR des souches mutantes sont indiqués par des têtes de flèche. Les produits d'amplification PCR attendus pour les différentes souches sont indiqués sous chaque structure
25 génétique.
30

Les transformants $\Delta pks13$ dans lesquels le chromosome génomique est transformé par le plasmide pCMS5::pks sont sélectionnés sur un milieu gélosé contenant de la kanamycine.

thermosensibilité qui les rend incapables de croître à des températures supérieures à 30°C contrairement au type sauvage qui produit des colonies sur milieu gélosé jusqu'à 37°C (4) une forte agrégation en culture liquide en absence de
5 détergent.

Ces transformants sont caractérisés par PCR en utilisant les amorces suivantes :

fa2 : 5'-TCTGACCACCTTCCGTGAAGC-3' (Tm=55°C ou 62°C)

(SEQ ID NO : 14)

10 ac2 : 5'-GAACGAGTTCAGAGCTTC-3' (Tm=55°C ou 62°C)

(SEQ ID NO : 15)

K10 : 5'-TATTTTGAATGGTTCGCTGGGTTTATC-3' (Tm=55°C)

(SEQ ID NO : 16)

K7 : 5'-TAAAAAGCTTATCGATACCG-3' (Tm=55°C)

15 (SEQ ID NO : 17)

pk1 : 5'-GCCGTGACGGTATCTCGG-3' (Tm=55°C)

(SEQ ID NO: 18)

pk2 : 5'-CCAGGGCAGTTGCTTCAATG-3' (Tm=55°C)

(SEQ ID NO: 19)

20 La Figure 3B présente les résultats d'analyse par PCR du mutant *Δpks13* et de la souche de type sauvage (WT) de *C. glutamicum*.

Souche mutante *Δpks13*:pCGL2308 de *C. glutamicum*

Un plasmide de complémentation, pCGL2308, est
25 produit par l'insertion dans le vecteur pCGL482 (PEYRET et al., Mol. Microbiol. 9 : 97-109, 1993) d'un fragment de 5,3 kb de *C. glutamicum*, comprenant le gène *pks13* et la région de 417 pb en amont de ce gène, obtenu par PCR à partir de l'ADN total de *C. glutamicum* en utilisant le couple
30 d'amorces suivant :

pk3 : 5'-TCCGGAAAGATCTCAGCCGCG-3' (Tm=62°C)

(SEQ ID NO : 20)

pk4 : 5'-GCGTGCGCGCAGATCTGCTAGC-3' (Tm=62°C)

(SEQ ID NO : 21)

35 Le plasmide pCGL2308 résultant est transféré par électroporation dans la souche *Δpks13* de *C. glutamicum* et

les transformants *Δpks13:pCGL2308* sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant de la kanamycine.

Les transformants *Δpks13:pCGL2308* présentent une morphologie brillante et lisse, une vitesse de croissance intermédiaire entre la souche sauvage et la souche mutante, une incapacité à pousser à des températures supérieures à 32°C (alors que la souche sauvage pousse à 37°C), ainsi qu'une teneur en acide mycolique beaucoup plus faible que celle de la souche sauvage.

Il apparaît donc que la complémentation par le plasmide induit une réversion partielle vers le phénotype sauvage.

Construction d'un mutant conditionnel de *M. smegmatis*

Souche mutante PMM47 de *M. smegmatis*

Deux fragments d'ADN d'environ 1 kb chevauchant le gène *pks13* sur ses extrémités 5' et 3' sont amplifiés par PCR à partir de l'ADN total de *M. smegmatis* en utilisant respectivement les couples d'amorces suivants :

13F : 5'-GCTCTAGAGTTTAAACGCTGGACCTGTCCAACGTCAAGG-3'

(SEQ ID NO : 22)

13G : 5'-GGACTAGTCGTCGAAACCGACCGTCACCAG-3'

(SEQ ID NO : 23)

et

13H : 5'-GGACTAGTCGGCATCTTCAACGAGTTGC-3'

(SEQ ID NO : 24)

13I : 5'-CCCAAGCTTGTTTAAACTTGTCGAAGTGGTTCGACGG-3'

(SEQ ID NO : 25)

Les conditions de PCR sont : 3 unités de polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me₂SO), 1 mM de dNTP et 1 μM de chaque amorce dans un volume final de 50 μl, dans les conditions recommandées par le fournisseur.

de résistance à l'hygromycine est insérée entre ces deux fragments PCR pour donner le plasmide pDP28. Ce plasmide non réplcatif contenant le marqueur *sacB* et une copie de l'allèle muté *pks13::hyg* est transféré dans la souche *M. smegmatis* par électroporation et les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant de l'hygromycine.

Les transformants ayant intégré le plasmide pDP28 par simple recombinaison entre les copies du type sauvage et muté du gène *pks13* sont caractérisés par PCR en utilisant les amorces suivantes :

13J : 5'-CTTCCACGACATGGTCTGAT-3' (SEQ ID NO : 26)
 13K : 5'-CACGATCGAGTCGAGCTCGA-3' (SEQ ID NO : 27)
 H1 : 5'-AGCACCAGCGGTTCGCCGT-3' (SEQ ID NO : 28)
 H2 : 5'-TGCACGACTTCGAGGTGTTTCG-3' (SEQ ID NO : 29)

Les conditions de PCR sont : 2,5 unités de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me₂SO), 1 mM de dNTP et 1 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 62°C, 2 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C. Une souche dénommée PMM47 de *M. smegmatis* est sélectionnée, dans laquelle le plasmide pDP28 s'est inséré au locus *pks13* par simple recombinaison. Des étalements à différentes températures (25°C, 32°C ou 37°C) d'une culture de PMM47, sur un milieu contenant 10% de sucrose et de l'hygromycine produit des clones avec une mutation dans le gène *sacB* mais aucun événement de seconde recombinaison pouvant produire une souche portant seulement l'allèle muté *pks13::hyg* n'est sélectionné.

Ce résultat indique que le gène *pks13* est essentiel pour la croissance des mycobactéries. Afin de confirmer cette hypothèse, une seconde copie du gène *pks13* de type sauvage est transférée dans PMM47 clonée sur un vecteur mycobactérien thermosensible.

Souche mutante thermosensible PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*

Pour produire le plasmide de complémentation pDP32, le gène *pks13* est amplifié par PCR à partir de l'ADN total de *M. smegmatis* en utilisant les amorces 13R 5'-ATGAGATCTGATGAAAACACAGCGAT-3' (SEQ ID NO : 30) et 13P 5'-GGACTAGTCTTGGCGACGGCCTTCTCAC-3' (SEQ ID NO : 31).

Les conditions de PCR sont : 3 unités d'ADN polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me₂SO), 1 mM de DNTP, et 1 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (PROMEGA, Lyon, France). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 58°C, 5 min à 72°C, puis 10 min à 72°C.

Le gène *pks13* est inséré dans un plasmide mycobactérien thermosensible dérivé du plasmide pCG63 (GUILHOT et al., FEMS Microbiol. Letter 98 : 181-186, 1992) et contenant une cassette d'expression mycobactérienne, avec un promoteur mycobactérien, pBlaF*, en amont d'un site multiple de clonage lui-même en amont d'un terminateur de transcription (LE DANTEC et al., J. Bacteriol. 183 : 2157-2164, 2001). Le plasmide pDP32 résultant est transféré par électroporation dans la souche PMM47 de *M. smegmatis* et les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant de la kanamycine et de l'hygromycine. La seconde recombinaison au locus chromosomique *pks13* est sélectionnée par étalement d'une culture liquide de ces transformants à 30°C sur milieu gélosé contenant de la kanamycine, de l'hygromycine et du sucrose à 30°C. Les colonies sont criblées par PCR en utilisant les amorces suivantes :

13J : 5'-CTTCCACGACATGGTCTGAT-3' (SEQ ID NO : 26)

13K : 5'-CAGCCTCGGCTGCGGCTCGA-3' (SEQ ID NO : 27)

un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 62°C, 2 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C.

La Figure 4A présente schématiquement la structure génétique du locus *pks13* obtenu au cours de la construction du mutant conditionnel PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*. Les boîtes indiquent les différents gènes du locus *pks13*. La localisation et le nom des amorces utilisées pour l'analyse par PCR des souches mutantes sont indiqués par des têtes de flèche. Les produits d'amplification PCR attendus pour les différentes souches sont indiqués sous chaque structure génétique.

La Figure 4B présente les résultats d'analyse par PCR du mutant conditionnel PMM48:pDP32 de *M. smegmatis* et de ses souches parentales PMM47 et mc²155 (WT).

En utilisant ces conditions, 8% des colonies sélectionnées Hyg^R, Km^R, Suc^R sont le résultat d'un échange allélique ; les autres clones étant le résultat d'une mutation du gène *sacB*.

La souche dénommée PMM48:pDP32, dans laquelle la copie chromosomique de type sauvage du gène *pks13* est remplacée par l'allèle muté *pks::hyg* et une copie du gène *pks13* fonctionnelle se trouve sur un plasmide thermosensible, est sélectionnée pour une analyse phénotypique. Les résultats sont représentés dans la Figure 4C.

Légende de la Figure 4C :

□ = souche recombinante PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*

◆ = souche de type sauvage (WT)

Des étalements de cette souche recombinante sur milieu gélosé contenant de l'hygromycine à 32°C ou 42°C révèlent qu'elle est incapable de former des colonies à température élevée. En culture liquide à 32°C, cette souche croît aussi vite que la souche de type sauvage, une température permissive pour le plasmide pDP32. Cependant, lorsque la culture est placée à 42°C, une température non

permissive pour le plasmide pDP32, le nombre de bactéries viables augmente jusqu'au temps 12h à 24h post-inoculation, puis demeure stable au cours des 24 heures suivantes avant de décroître ; les seules bactéries viables sont celles qui ont conservé une copie du plasmide de complémentation.

Ces résultats montrent que le gène *pks13* est essentiel pour la survie de *M. smegmatis*, comme attendu d'un gène codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques.

Analyse biochimique des mutants $\Delta pks13$ de *C. glutamicum* et PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*

Protocole d'analyse

Les souches de *C. glutamicum* sont mises en culture jusqu'en phase exponentielle et marquées avec de l'acétate [^{14}C] 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ (activité spécifique de 54 mCi/mmol ; ICN, Orsay, France) pendant 3h. Pour le radiomarquage du mutant conditionnel de *M. smegmatis* à température non permissive, PMM48:pDP32 et la souche de type sauvage mc²155 sont mises en culture à 30°C. Ces cultures sont ensuite diluées dans du milieu frais à une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,005$ et incubées à 42°C jusqu'à une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,3$. Les cellules sont ensuite marquées pendant 3h avec de l'acétate [^{14}C] 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$.

Les acides gras sont préparés à partir des cellules marquées et séparés par chromatographie sur couche mince sur Durasil 25 en utilisant du dichlorométhane ou un mélange éther/diéthyléther (9:1) comme éluant comme décrit dans LAVAL et al. (Anal. Chem. 73 : 4537-4544, 2001). Les composés marqués sont quantifiés sur un Phosphomalger (AMERSHAM BIOSCIENCES).

Pour les analyses par chromatographie en phase

gaz de réaction (Cl/NH_3), couplé avec un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5890 series II associé à une colonne OV1 similaire (0,30 mm x 12 m).

Résultats

5 Mutants *Δpks13* et *Δpks13:pCGL2308* de *C. glutamicum*

La Figure 3C illustre le résultat de l'analyse des acides gras libérés après saponification à partir de la souche de type sauvage (WT) et des mutants *Δpks13* et *Δpks13:pCGL2308* de *C. glutamicum*. L'analyse par chromatographie sur couche mince de ces produits révèle que les spots correspondant aux acides mycoliques ou à la palmitone, un produit de dégradation de l'intermédiaire β-ceto acyl résultant de la réaction de condensation, ne sont plus détectables chez les mutants. Cette observation est confirmée par l'analyse en GC-MS qui démontre que le mutant *Δpks13* de *C. glutamicum* ne synthétise plus d'acides mycoliques mais produit une quantité similaire d'acides gras C16-C18, le précurseur de mycolate, de celle de la souche de type sauvage (données non représentées). Cette production d'acides mycoliques est partiellement restaurée suite au transfert dans la souche mutante *Δpks13* d'un plasmide portant le gène *pks13* fonctionnel de *C. glutamicum* ; ce qui démontre que ces phénotypes sont effectivement dus à la délétion de *pks13*. La restauration partielle suggère soit que l'expression de *pks13* par le plasmide n'est pas du même niveau que celle dans la souche de type sauvage, soit que l'insertion chromosomique de la cassette kanamycine exerce un effet polaire sur l'expression du gène *accD4*, ou les deux.

En outre, dans les Mycolatas, les acides mycoliques sont supposés contribuer à la bicouche lipidique qui forme un homologue fonctionnel à la membrane externe des bactéries Gram-négative. Chez les corynébactéries et les mycobactéries, un plan de cryofracture se propage entre les deux couches de cette pseudo membrane externe. Comme attendu, la Figure 3D montre la perte de ce plan de fracture dans la souche mutant *Δpks13* de *C. glutamicum* alors qu'il est clairement visible dans la souche de type sauvage, ce qui

suggère que la bicouche lipidique composée majoritairement d'acides mycoliques n'est plus présente dans le mutant.

Ces résultats montrent que le mutant *Δpks13* de *C. glutamicum* est bien dépourvu d'une enzyme essentielle dans la biosynthèse des acides mycoliques.

Mutant PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*

La Figure 4D illustre le résultat de l'analyse des acides gras libérés après saponification à partir de la souche de type sauvage de *M. smegmatis* et du mutant conditionnel PMM48:pDP32, après croissance à température permissive (30°C) ou non permissive (42°C). Le rapport mycolates/acides gras à chaîne courte est quantifié pour le mutant PMM48:pDP32 et divisé par celui obtenu pour la souche de type sauvage cultivée dans les mêmes conditions. Le graphe montre qu'après transfert à 42°C, le contenu moyen en mycolate dans le mutant PMM48:pDP32 est diminué de plus de 60%. Comme attendu, cette synthèse n'est pas complètement stoppée dans la culture du fait que la population bactérienne restante conservant le plasmide de complémentation non réplcatif produit des acides mycoliques.

Ces résultats montrent que le gène *pks13* est impliqué dans la biosynthèse des acides mycoliques chez *M. smegmatis*.

REVENDECATIONS

1) Protéine purifiée, caractérisée en ce que :

- a) elle possède au moins 40% d'identité, sur la totalité de sa séquence, avec la protéine Pks13 de *M. tuberculosis* ;
 5 b) elle possède un domaine acyl transférase (pfam00698), un domaine kétoacylsynthase (pfam02801 ou pfam00109), au moins un domaine acyl carrier protein (COG0331 ou COG0304), et un domaine thioestérase (COG3319 ou pfam00975)
 10 c) elle catalyse une condensation de Claisen entre une molécule d'acyl-CoA et une molécule d'acylmalonyl-CoA.

2) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle catalyse une condensation de Claisen entre :

a) une molécule d'acyl-CoA de formule I :

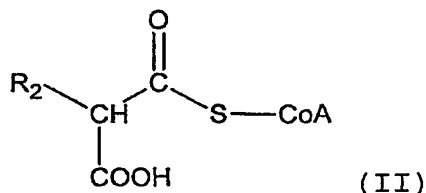


dans laquelle R1 est une chaîne comprenant de 6 à 68 atomes de carbone, pouvant comporter une ou plusieurs doubles liaisons C=C, et/ou un ou plusieurs cycles *cis/trans*-cyclopropane, et/ou un ou plusieurs groupes $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}- \end{array}$ et/ou pouvant porter un ou plusieurs groupes latéraux choisis parmi -CH₃, =O, -O-CH₃ ;

20

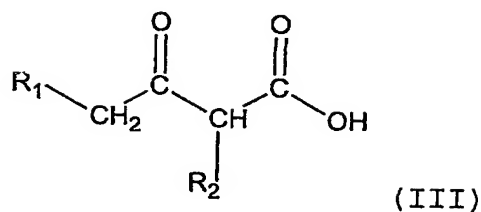
et

b) une molécule d'acylmalonyl-CoA de formule II :



25 dans laquelle R2 est un alcane linéaire comprenant de 10 à 24 atomes de carbone ;

pour former un intermédiaire β-ceto acyl de formule III :



dans laquelle R1 et R2 sont telles que définis ci-dessus.

3) Protéine selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle présente au moins 70% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1 de *Mycobacterium tuberculosis*.

4) Protéine selon une quelconque des revendicationq 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle présente au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 2 de *Corynebacterium glutamicum*.

5) Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence polynucléotidique codant pour une protéine selon une quelconque des revendications 1 à 4.

6) Cellule-hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression selon la revendication 5.

7) Cellule-hôte selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote.

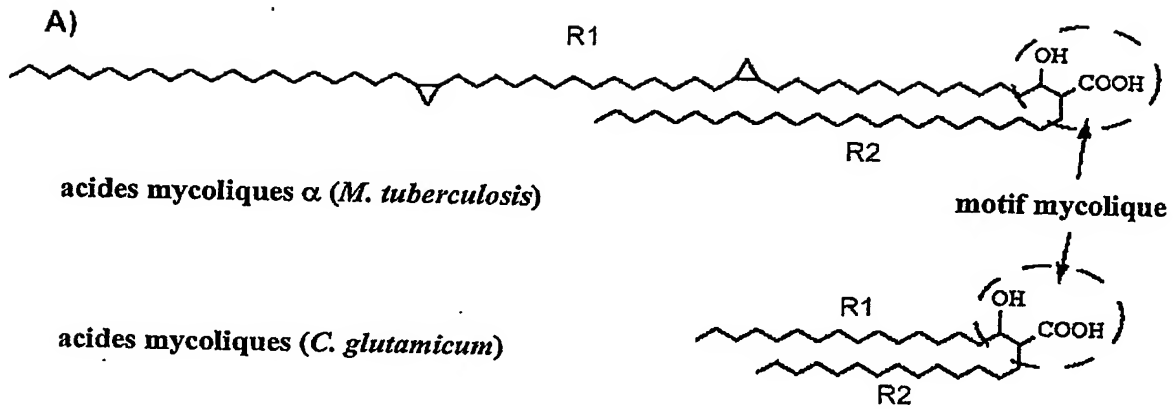
8) Procédé d'obtention d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en culture d'une cellule hôte selon une quelconque des revendications 6 ou 7 ; et
- la purification de ladite protéine à partir de ladite culture.

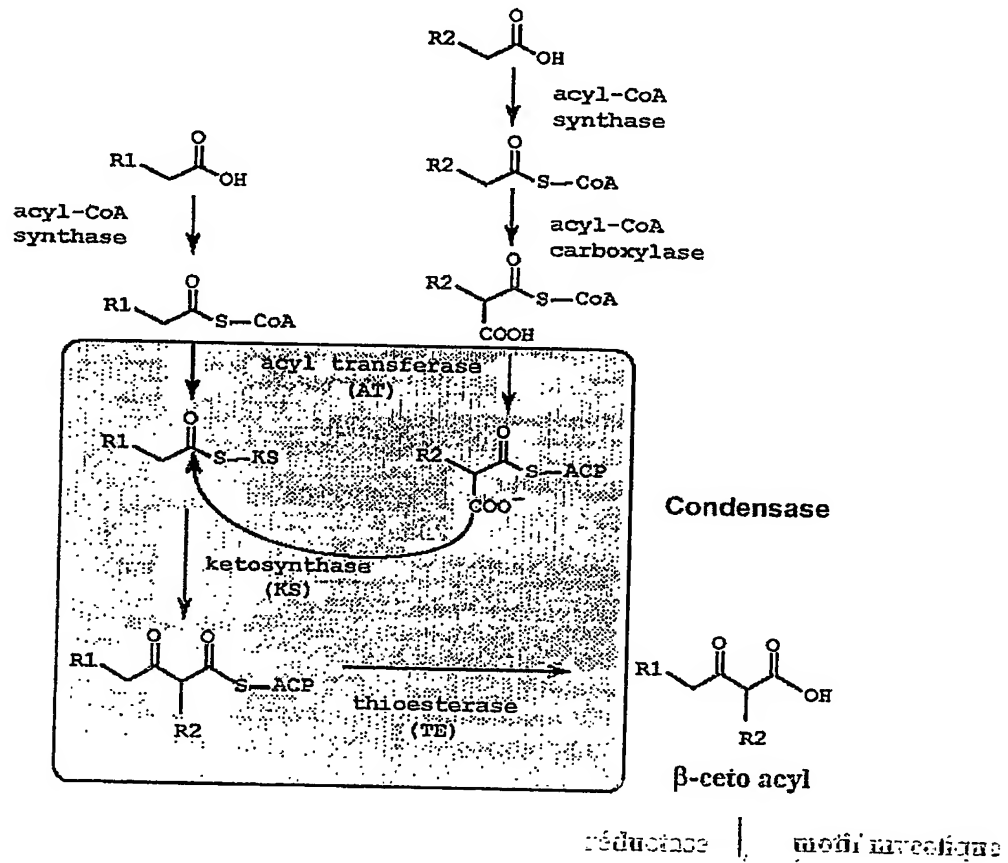
10) Utilisation d'une protéine selon une quelconque des revendications 1 à 4, pour le criblage d'antibiotiques actifs sur les mycolatas.

11) Utilisation selon la revendication 10, pour
5 le criblage d'antibiotiques actifs sur les mycobactéries.

1/6



B)



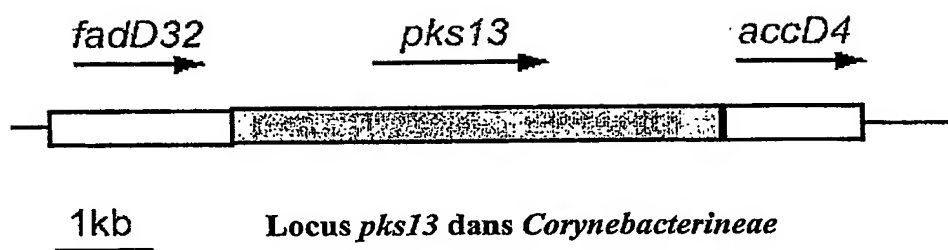
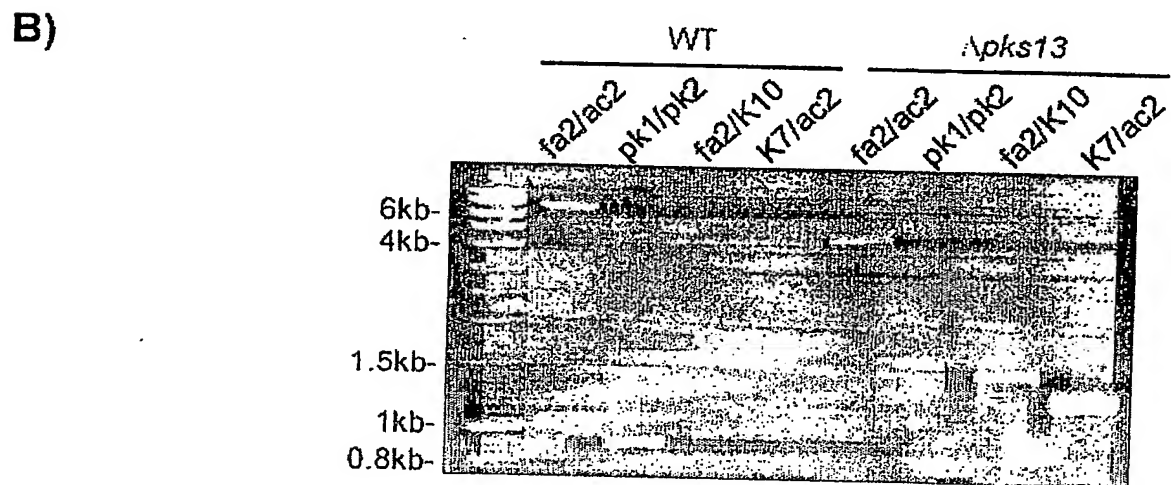
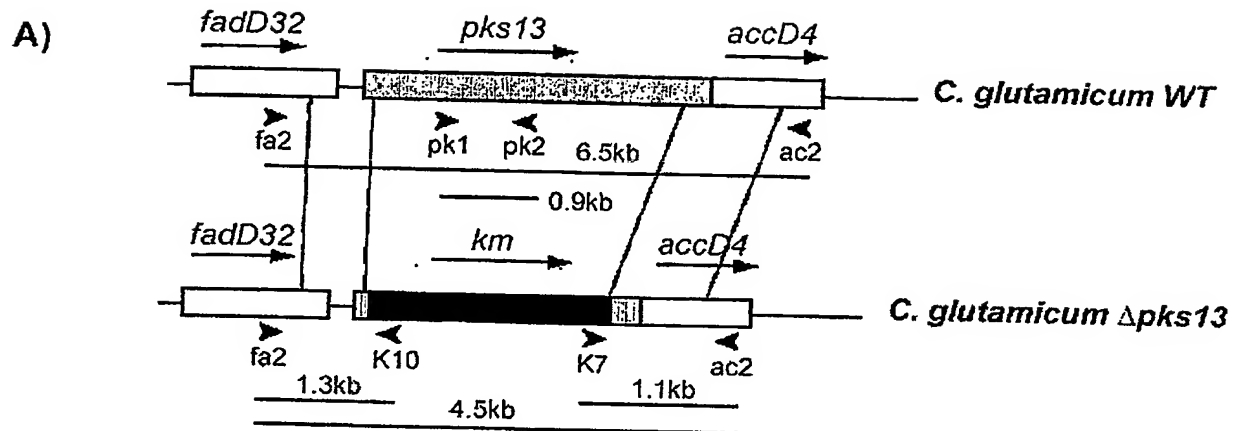
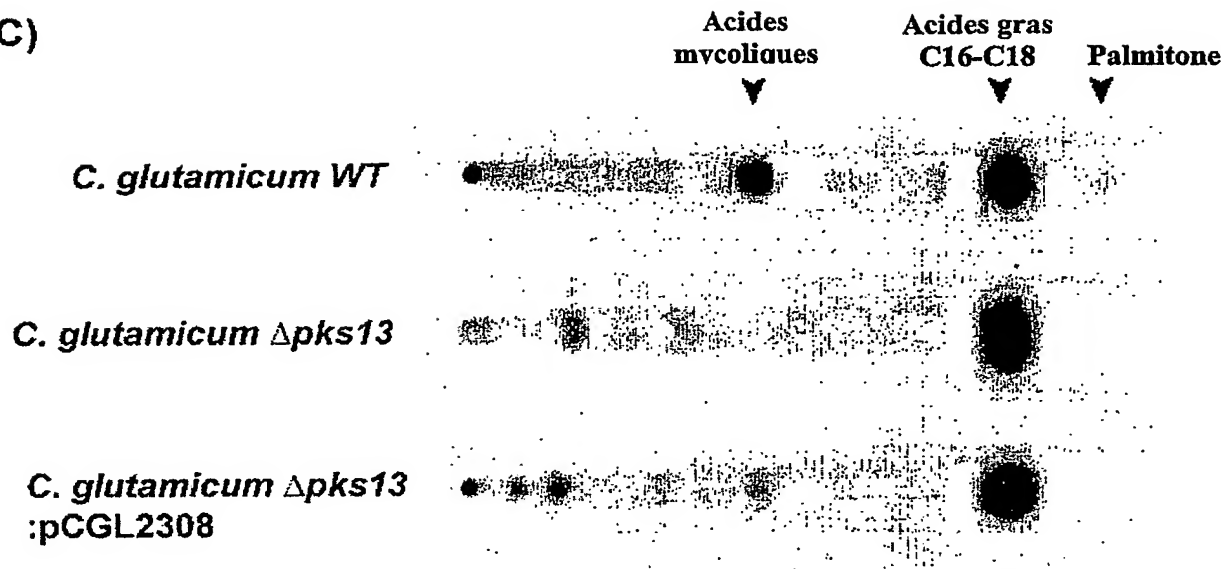


FIG. 2



C)



D)

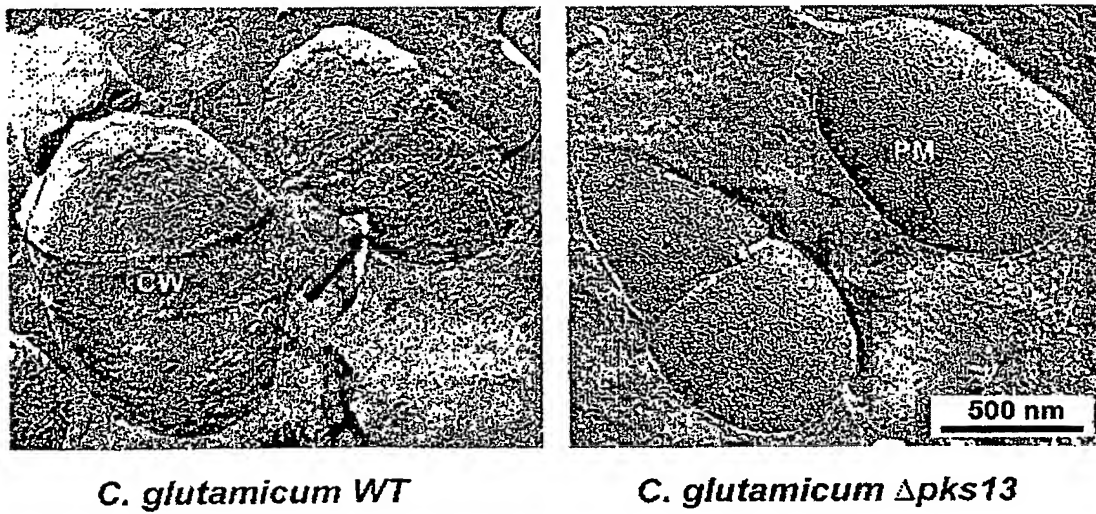
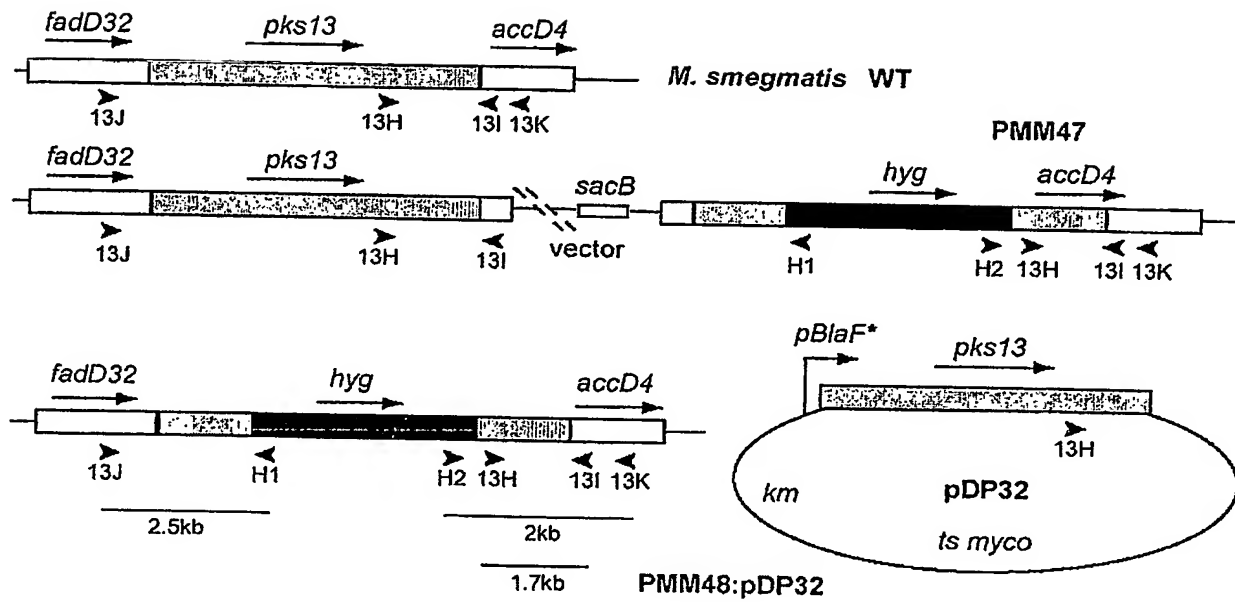


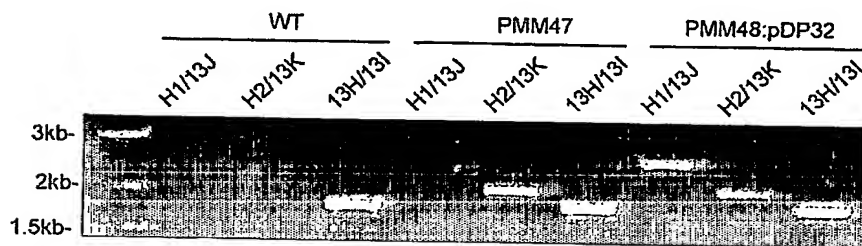
FIG.3 (suite)

5/6

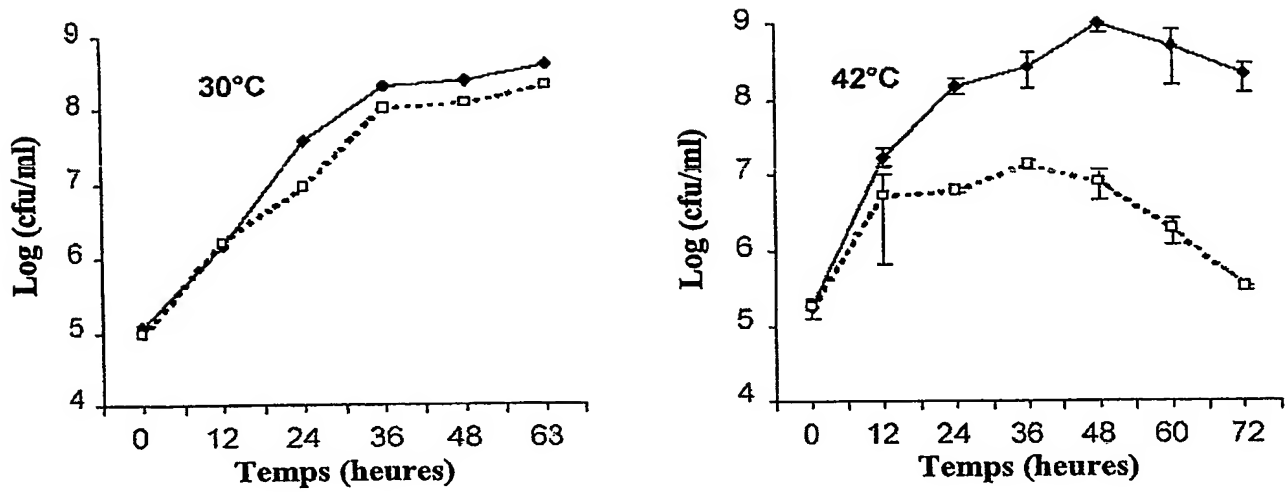
A)



B)



C)



D)

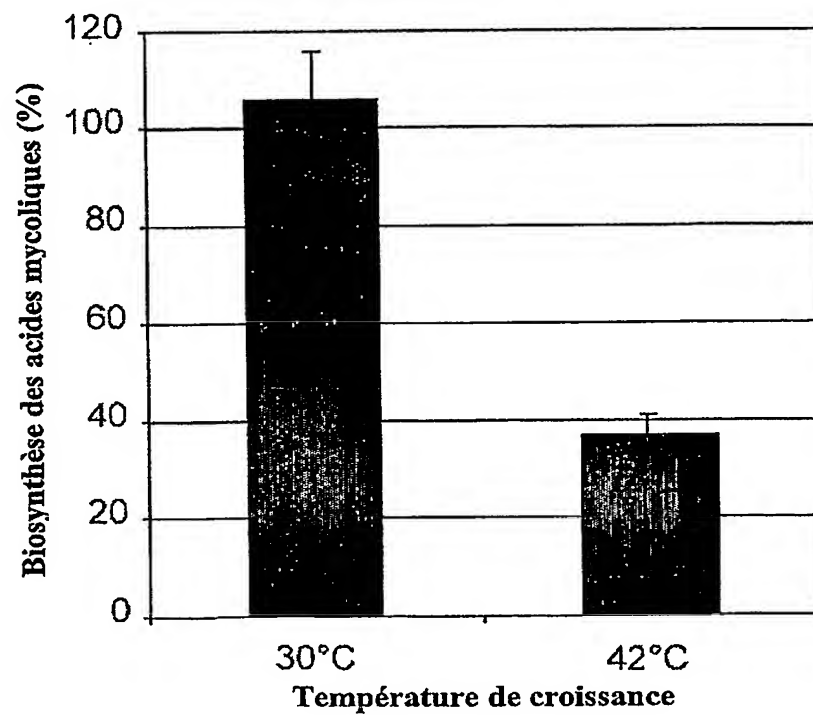


FIG. 4 (SUITE)

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
 UNIVERSITE PARIS SUD XI
 GUILHOT, Christophe
 DAFRE, Mamadou
 HOUSSIN, Christine
 PORTEVIN, Damien
 DE SOUSA, Célia

<120> UTILISATION DE LA PROTEINE PKS13 CODANT POUR LA CONDENSASE
 DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES
 COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES

<130> MJPbv644-112

<160> 31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1733

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1

Met Ala Asp Val Ala Glu Ser Gln Glu Asn Ala Pro Ala Glu Arg Ala
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Val Pro Glu Met Arg Gln Trp Leu Arg Asn Trp Val Gly
 20 25 30

Lys Ala Val Gly Lys Ala Pro Asp Ser Ile Asp Glu Ser Val Pro Met
 35 40 45

Val Glu Leu Gly Leu Ser Ser Arg Asp Ala Val Ala Met Ala Ala Asp
 50 55 60

Ile Glu Asp Leu Thr Gly Val Thr Leu Ser Val Ala Val Ala Phe Ala
 65 70 75 80

His Pro Thr Ile Glu Ser Leu Ala Thr Arg Ile Ile Glu Gly Glu Pro
 85 90 95

Glu Thr Asp Leu Ala Gly Asp Asp Ala Glu Asp Trp Ser Arg Thr Gly
 100 105 110

Phe Ala Gly Asp Val Ser Ile Ala Ile Val Gly Leu Ser Thr Ser Thr

Leu	Glu	Glu	Pro	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Gly	Ala	Arg	Thr	Arg		
				165					170					175			
Gly	Gly	Tyr	Leu	Lys	Asp	Ile	Lys	Gly	Phe	Asp	Ser	Glu	Phe	Phe	Ala		
			180					185					190				
Val	Ala	Lys	Thr	Glu	Ala	Asp	Asn	Ile	Asp	Pro	Gln	Gln	Arg	Met	Ala		
		195					200					205					
Leu	Glu	Leu	Thr	Trp	Glu	Ala	Leu	Glu	His	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Ser		
	210					215					220						
Ser	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	Ile	Gly	Ser	Ser	Thr	Asn		
225					230					235					240		
Asp	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Val	Ser	Asp	Pro	Thr	Val	Ala	His	Pro	Tyr		
				245					250					255			
Ala	Ile	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Ile	Ala	Asn	Arg	Val	Ser	Tyr		
			260					265					270				
Phe	Tyr	Asp	Phe	His	Gly	Pro	Ser	Val	Thr	Ile	Asp	Thr	Ala	Cys	Ser		
		275					280					285					
Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Ile	His	Gln	Gly	Val	Gln	Ala	Leu	Arg	Asn	Gly		
	290					295					300						
Glu	Ala	Asp	Val	Val	Val	Ala	Gly	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro		
305					310					315					320		
Met	Val	Thr	Leu	Gly	Phe	Asp	Glu	Ile	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	Asp		
				325					330					335			
Gly	Arg	Ile	Lys	Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	Ala	Asp	Gly	Tyr	Thr	Arg	Ser		
			340					345					350				
Glu	Gly	Gly	Gly	Met	Leu	Val	Leu	Lys	Arg	Val	Asp	Asp	Ala	Arg	Arg		
		355					360					365					
Asp	Gly	Asp	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Ile	Ala	Gly	Ser	Ala	Val	Asn	His		
	370					375					380						
Asp	Gly	Arg	Ser	Asn	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Asn	Gln	Asp	Ala	Gln	Ala		
385					390					395					400		
Asp	Val	Leu	Arg	Arg	Ala	Tyr	Lys	Asp	Ala	Gly	Ile	Asp	Pro	Arg	Thr		
				405					410					415			
Val	Asp	Tyr	Ile	Glu	Ala	His	Gly	Thr	Gly	Thr	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro		
			420					425					430				
Ile	Glu	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Arg	Gly	Arg	Pro	Ala		
		435					440					445					
Asp	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Lys	Thr	Asn	Val	Gly	His	Leu		
	450					455					460						



Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Met	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Ala	Leu	465	470	475	480
Gln	His	Asp	Lys	Leu	Pro	Pro	Ser	Ile	Asn	Phe	Ala	Gly	Pro	Ser	Pro	485	490	495	
Tyr	Ile	Asp	Phe	Asp	Ala	Met	Arg	Leu	Lys	Met	Ile	Thr	Thr	Pro	Thr	500	505	510	
Asp	Trp	Pro	Arg	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Ser	Ser	Phe	515	520	525	
Gly	Phe	Gly	Gly	Ala	Asn	Ala	His	Val	Val	Val	Arg	Glu	Val	Leu	Pro	530	535	540	
Arg	Asp	Val	Val	Glu	Lys	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Lys	Ala	545	550	555	560
Ala	Ala	Glu	Pro	Ala	Glu	Ala	Pro	Thr	Leu	Ala	Gly	His	Ala	Leu	Arg	565	570	575	
Phe	Asp	Glu	Phe	Gly	Asn	Ile	Ile	Thr	Asp	Ser	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	580	585	590	
Pro	Glu	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Lys	595	600	605	
Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala	Gln	Glu	Val	Thr	Ala	Pro	Leu	610	615	620	
Val	Pro	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Phe	Leu	Thr	Ser	Arg	Lys	Lys	Ala	Ala	625	630	635	640
Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Asp	Trp	Met	Gln	Ser	Pro	Glu	Gly	Gln	Ala	Ser	645	650	655	
Ser	Leu	Glu	Ser	Ile	Gly	Arg	Ser	Leu	Ser	Arg	Arg	Asn	His	Gly	Arg	660	665	670	
Ser	Arg	Ala	Val	Val	Leu	Ala	His	Asp	His	Asp	Glu	Ala	Ile	Lys	Gly	675	680	685	
Leu	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Gly	Lys	Gln	Ala	Pro	Asn	Val	Phe	Ser	Val	690	695	700	
Asp	Gly	Pro	Val	Thr	Thr	Gly	Pro	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Gly	Phe	Gly	705	710	715	720

Ile	Glu	Thr	Thr	Gln	Val	Thr	Ile	Phe	Ala	Ile	Gln	Ile	Ala	Leu	Gly	
770						775					780					
Glu	Leu	Leu	Arg	His	His	Gly	Ala	Lys	Pro	Ala	Ala	Val	Ile	Gly	Gln	
785					790					795					800	
Ser	Leu	Gly	Glu	Ala	Ala	Ser	Ala	Tyr	Phe	Ala	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	
				805					810					815		
Arg	Asp	Ala	Thr	Arg	Ala	Ile	Cys	Ser	Arg	Ser	His	Leu	Met	Gly	Glu	
			820					825					830			
Gly	Glu	Ala	Met	Leu	Phe	Gly	Glu	Tyr	Ile	Arg	Leu	Met	Ala	Leu	Val	
		835					840					845				
Glu	Tyr	Ser	Ala	Asp	Glu	Ile	Arg	Glu	Val	Phe	Ser	Asp	Phe	Pro	Asp	
	850					855					860					
Leu	Glu	Val	Cys	Val	Tyr	Ala	Ala	Pro	Thr	Gln	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	
865					870					875					880	
Pro	Pro	Glu	Gln	Val	Asp	Ala	Ile	Leu	Ala	Arg	Ala	Glu	Ala	Glu	Gly	
				885					890					895		
Lys	Phe	Ala	Arg	Lys	Phe	Ala	Thr	Lys	Gly	Ala	Ser	His	Thr	Ser	Gln	
			900					905					910			
Met	Asp	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	Ile	Lys	
		915					920					925				
Pro	Thr	Ser	Pro	Thr	Cys	Gly	Ile	Phe	Ser	Thr	Val	His	Glu	Gly	Arg	
		930				935					940					
Tyr	Ile	Lys	Pro	Gly	Gly	Glu	Pro	Ile	His	Asp	Val	Glu	Tyr	Trp	Lys	
945					950					955					960	
Lys	Gly	Leu	Arg	His	Ser	Val	Tyr	Phe	Thr	His	Gly	Ile	Arg	Asn	Ala	
				965					970					975		
Val	Asp	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Phe	Leu	Glu	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Val	
			980					985					990			
Ala	Leu	Met	Gln	Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	Asp	Ala	Gly	Leu	His	Asp	
		995					1000					1005				
Ala	Gln	Leu	Ile	Pro	Thr	Leu	Ala	Arg	Lys	Gln	Asp	Glu	Val	Ser	Ser	
	1010					1015					1020					
Met	Val	Ser	Thr	Met	Ala	Gln	Leu	Tyr	Val	Tyr	Gly	His	Asp	Leu	Asp	
1025					1030					1035					1040	
Ile	Arg	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly	Pro	Gln	Asp	Tyr	Ala	Asn	
				1045					1050					1055		
Ile	Pro	Pro	Thr	Arg	Phe	Lys	Arg	Lys	Glu	His	Trp	Leu	Pro	Ala	His	
			1060					1065					1070			



Phe Ser Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Met Pro Gly Thr His Val Ala Leu
 1075 1080 1085
 Pro Asp Gly Arg His Val Trp Glu Tyr Ala Pro Arg Asp Gly Asn Val
 1090 1095 1100
 Asp Leu Ala Ala Leu Val Arg Ala Ala Ala Ala His Val Leu Pro Asp
 1105 1110 1115 1120
 Ala Gln Leu Thr Ala Ala Glu Gln Arg Ala Val Pro Gly Asp Gly Ala
 1125 1130 1135
 Arg Leu Val Thr Thr Met Thr Arg His Pro Gly Gly Ala Ser Val Gln
 1140 1145 1150
 Val His Ala Arg Ile Asp Glu Ser Phe Thr Leu Val Tyr Asp Ala Leu
 1155 1160 1165
 Val Ser Arg Ala Gly Ser Glu Ser Val Leu Pro Thr Ala Val Gly Ala
 1170 1175 1180
 Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Asp Gly Ala Pro Val Ala Pro Glu Thr
 1185 1190 1195 1200
 Pro Ala Glu Asp Ala Asp Ala Glu Thr Leu Ser Asp Ser Leu Thr Thr
 1205 1210 1215
 Arg Tyr Met Pro Ser Gly Met Thr Arg Trp Ser Pro Asp Ser Gly Glu
 1220 1225 1230
 Thr Ile Ala Glu Arg Leu Gly Leu Ile Val Gly Ser Ala Met Gly Tyr
 1235 1240 1245
 Glu Pro Glu Asp Leu Pro Trp Glu Val Pro Leu Ile Glu Leu Gly Leu
 1250 1255 1260
 Asp Ser Leu Met Ala Val Arg Ile Lys Asn Arg Val Glu Tyr Asp Phe
 1265 1270 1275 1280
 Asp Leu Pro Pro Ile Gln Leu Thr Ala Val Arg Asp Ala Asn Leu Tyr
 1285 1290 1295
 Asn Val Glu Lys Leu Ile Glu Tyr Ala Val Glu His Arg Asp Glu Val
 1300 1305 1310
 Gln Gln Leu His Glu His Gln Lys Thr Gln Thr Ala Glu Glu Ile Ala
 1315 1320 1325

1. *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* contents were determined by spectrophotometry using the method of Lichtenthaler and Whistler (1987).

Asp Asp Ala Ile Met Phe Glu Pro Arg Tyr Ala Val Arg Gln Pro Asp
1665 1670 1675 1680

Gly Gly Trp Gly Glu Tyr Val Ser Asp Leu Glu Val Val Pro Ile Gly
1685 1690 1695

Gly Glu His Ile Gln Ala Ile Asp Glu Pro Ile Ile Ala Lys Val Gly
1700 1705 1710

Glu His Met Ser Arg Ala Leu Gly Gln Ile Glu Ala Asp Arg Thr Ser
1715 1720 1725

Glu Val Gly Lys Gln
1730

<210> 2
<211> 1610
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
Met Glu Gln Ser Gln Ser Ser Asp Gln Lys Met Thr Val Glu Gln Val
1 5 10 15

Arg Thr Trp Leu Arg Asp Trp Val Val Arg Thr Thr Gly Ile Pro Val
20 25 30

Glu Glu Val Thr Asp Asp Lys Ala Met Glu Thr Phe Gly Leu Ser Ser
35 40 45

Arg Asp Val Val Val Leu Ser Gly Glu Leu Glu Asn Leu Leu Asp Thr
50 55 60

Ser Leu Asp Ala Thr Ile Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Ile Arg Ser Leu
65 70 75 80

Ala Gln Arg Leu Val Glu Gly Glu Pro Arg Arg Ala His Thr Gln Arg
85 90 95

Glu Leu Asn Phe Ser Ala Val Ser Asp Ser Pro Gly Ser His Asp Ile
100 105 110

Ala Val Val Gly Met Ala Ala Arg Tyr Pro Gly Ala Glu Ser Leu Glu
115 120 125

Asp Met Thr Lys Leu Val Val Glu Gly Ile Asp Phe Ala Ser Thr Leu
130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200

Ser	Phe	Asp	Ala	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Leu	Glu	Ala	Ala	Asn	
			180					185					190			
Met	Asp	Pro	Gln	Gln	Arg	Ile	Leu	Leu	Glu	Leu	Thr	Trp	Glu	Ala	Leu	
		195					200					205				
Glu	Tyr	Ala	Arg	Ile	Ala	Pro	Asn	Thr	Leu	Arg	Gly	Glu	Ala	Val	Gly	
	210					215					220					
Val	Phe	Ile	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asp	Tyr	Gly	Met	Met	Ile	Ala	Ala	
225					230					235					240	
Asp	Pro	Ala	Glu	Ala	His	Pro	Tyr	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	
				245					250					255		
Ile	Val	Ala	Asn	Arg	Ile	Asn	Tyr	Ala	Phe	Asp	Phe	Arg	Gly	Pro	Ser	
			260					265					270			
Val	Asn	Val	Asp	Thr	Ala	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Val	His	Gln	
		275					280					285				
Ala	Val	Arg	Ala	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Ala	Asp	His	Ala	Ile	Ala	Gly	
	290					295					300					
Gly	Val	Asn	Ile	Leu	Ala	Ser	Pro	Phe	Val	Thr	Thr	Ala	Phe	Ala	Glu	
305					310					315					320	
Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Pro	Thr	Gly	Lys	Ile	His	Ala	Phe	Ser	Asp	Asp	
				325					330					335		
Ala	Asp	Gly	Phe	Val	Arg	Ser	Asp	Gly	Ala	Gly	Val	Val	Val	Leu	Lys	
			340					345					350			
Arg	Val	Asp	Asp	Ala	Ile	Arg	Asp	Gly	Asp	Lys	Ile	Ile	Gly	Val	Ile	
		355					360					365				
Lys	Gly	Ser	Ala	Val	Asn	Ser	Asp	Gly	His	Ser	Asn	Gly	Leu	Thr	Ala	
	370					375					380					
Pro	Asn	Pro	Asp	Ala	Gln	Val	Asp	Val	Leu	Gln	Arg	Ala	Tyr	Val	Asp	
385					390					395					400	
Ala	Gln	Val	Asp	Pro	Thr	Thr	Val	Asp	Tyr	Val	Glu	Ala	His	Gly	Thr	
				405					410					415		
Gly	Thr	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Ile	Glu	Ala	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Val	
			420					425					430			
Leu	Gly	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Leu	Gly	Ser	Ala	
		435					440					445				
Lys	Ser	Asn	Phe	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	Val	
	450					455					460					
Ile	Lys	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Gln	Asn	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	
465					470					475					480	

Asn	Phe	Ala	Gly	Pro	Asn	Arg	Tyr	Ile	Asp	Phe	Asp	Ala	Glu	Arg	Leu	
				485					490					495		
Glu	Val	Val	Glu	Asp	Pro	Arg	Glu	Trp	Pro	Glu	Tyr	Asn	Gly	His	Ala	
			500					505					510			
Val	Ala	Gly	Val	Ser	Ala	Phe	Gly	Phe	Gly	Gly	Thr	Asn	Ala	His	Val	
		515					520					525				
Val	Ile	Ser	Glu	Tyr	Asn	Ala	Glu	Asp	Tyr	Glu	Thr	Arg	Ala	Pro	Lys	
	530					535					540					
Glu	Ala	Leu	Leu	Pro	Asp	Gln	Gln	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Ser	Gly	His	
545					550					555					560	
Leu	Pro	Ser	Arg	Arg	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Ala	Asp	Phe	Leu	
				565					570					575		
Glu	Gly	Arg	Lys	Asp	Cys	Asp	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	
			580					585					590			
Gly	Arg	Asn	His	Gly	Arg	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Thr	Ile	
		595					600					605				
Glu	Glu	Ala	Val	Lys	Arg	Leu	Arg	Gln	Val	Ala	Glu	Gly	Lys	Val	Ser	
	610					615					620					
Val	Gly	Ile	Ser	Ala	Ala	Asp	Ser	Pro	Ala	Ala	Asn	Gly	Pro	Val	Phe	
625					630					635					640	
Val	Tyr	Ser	Gly	Phe	Gly	Ser	Gln	His	Arg	Leu	Met	Ile	Lys	Glu	Leu	
				645					650					655		
Cys	Ser	Ile	Ser	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu	Arg	Ile	Glu	Glu	Leu	Asp	Glu	
			660					665					670			
Met	Val	Lys	Phe	Glu	Ser	Gly	Trp	Ser	Ile	Met	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	
		675					680					685				
Asp	Glu	Gln	Thr	Tyr	Asp	Thr	Glu	Thr	Ala	Gln	Val	Val	Ile	Thr	Ala	
	690					695					700					
Ile	Gln	Ile	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Ala	Ser	Phe	Gly	Val	Lys	Pro	
705					710					715					720	
Ala	Ala	Val	Met	Gly	Met	Ser	Met	Gly	Glu	Ile	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ala	
				725					730					735		

Ile	Glu	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Lys	Gly	Ile	Glu	Pro	Ala	Val	Tyr	Ala	
785					790					795					800	
Gly	Pro	Gly	Met	Thr	Thr	Val	Gly	Gly	Pro	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Gln	
				805					810					815		
Phe	Val	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Lys	Phe	Ala	Arg	Leu	Leu	Asn	
			820					825					830			
Val	Lys	Gly	Ala	Gly	His	Thr	Ser	Ala	Val	Glu	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	
		835					840					845				
Leu	Ala	Gly	Glu	Ile	Ala	Gly	Ile	Glu	Pro	Leu	Pro	Leu	Gln	Ile	Pro	
	850					855					860					
Leu	Phe	Ser	Ser	Val	Asp	Gln	Gly	Val	Thr	Tyr	Pro	Val	Gly	Ala	Val	
865					870					875					880	
Val	His	Asp	Ala	Asp	Tyr	Met	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Gln	Ser	Val	Tyr	
				885					890					895		
Phe	Gln	Asp	Ser	Thr	Glu	Ala	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	His	Asn	Thr	Leu	
			900					905					910			
Val	Glu	Ile	Ser	Pro	Asn	Pro	Val	Ala	Leu	Met	Gly	Met	Met	Asn	Thr	
		915					920					925				
Ala	Phe	Thr	Val	Gly	Lys	Pro	Asp	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Lys	
	930					935					940					
Arg	Lys	Val	Pro	Glu	Ala	Glu	Ser	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Leu	
945					950					955					960	
Tyr	Val	Asn	Gly	Ala	Asn	Val	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	Tyr	Gly	Glu	Gly	
				965					970					975		
Glu	Thr	Ile	Asp	Pro	Pro	His	Ile	Thr	Trp	Lys	His	Gln	Arg	Phe	Trp	
			980					985					990			
Thr	Ser	Ala	Arg	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Leu	Asp	Leu	Pro	Gly	Phe	
		995					1000					1005				
Arg	Val	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	Val	Ala	Phe	Ser	Thr	Ala	Ala	Glu	
	1010					1015					1020					
Leu	Ala	Pro	Ser	Ala	Val	Ala	Ile	Met	Glu	Ala	Ala	Ala	Met	Ala	Val	
1025					1030					1035					1040	
Thr	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Asp	Glu	Arg	Asp	Met	Leu	Pro	
				1045					1050					1055		
Pro	Ser	Gly	Glu	Ile	Thr	Thr	Ile	Val	Thr	Arg	Ser	Leu	Gly	Gly	Leu	
			1060					1065					1070			
Ser	Leu	Ser	Val	Tyr	Lys	Ile	Glu	Gly	Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Val	Ala	
			1075				1080					1085				

Glu Gly Phe Ala Ala Asn Pro Gly Phe Ala Ala Ala Ser Ser Phe Asp
1090 1095 1100

Gly Pro Gly Tyr Asp Gly Phe Asn Thr Asp Tyr Ser Asp Gln Pro Asp
1105 1110 1115 1120

Pro Arg Ser Asp Leu Pro Leu Asp Ile Glu Ala Val Arg Trp Asp Pro
1125 1130 1135

Ala Thr Glu Thr Val Glu Glu Arg Met Arg Ala Ile Val Ser Glu Ala
1140 1145 1150

Met Gly Tyr Asp Val Asp Asp Leu Pro Arg Glu Leu Pro Leu Ile Asp
1155 1160 1165

Leu Gly Leu Asp Ser Leu Met Gly Met Arg Ile Lys Asn Arg Ile Glu
1170 1175 1180

Asn Asp Phe Gln Ile Pro Pro Leu Gln Val Gln Ala Leu Arg Asp Ala
1185 1190 1195 1200

Ser Val Ala Asp Val Val Ile Met Val Glu Asn Met Val Ala Gly Arg
1205 1210 1215

Ser Ser Glu Thr Leu Val Asp Ala Thr Pro Gln Val Pro Ala Glu Ala
1220 1225 1230

Ala Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Ser Ser Ala Ser Gly Glu Asp Val
1235 1240 1245

Gln Gly Val Gly Val Ala Pro Arg Asp Ala Ser Glu Arg Met Val Phe
1250 1255 1260

Gly Thr Trp Ala Gly Leu Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Val Thr Ser
1265 1270 1275 1280

Lys Leu Pro Gln Ile Asp Val Asp Thr Ala Thr Ala Ile Ala Glu Arg
1285 1290 1295

Leu Thr Glu Arg Ser Gly Ile Glu Ile Ser Thr Glu Gln Val Leu Ala
1300 1305 1310

Ala Glu Thr Leu Glu Pro Leu Ser Asp Leu Val Arg Glu Gly Leu Glu
1315 1320 1325

Thr Glu Val Gln Gly Asn Ile Arg Val Leu Arg Gly Arg Ala Glu Gly
1330 1335 1340

Tyr Val Asp Asp Ile Lys Lys Tyr Ser Asp Gly Phe Pro Val Val Leu
 1395 1400 1405
 Gly Gly Trp Ser Phe Gly Gly Ala Val Ala Phe Glu Val Ala His Gln
 1410 1415 1420
 Leu Val Gly Ser Asp Val Glu Val Ala Thr Val Ala Leu Leu Asp Thr
 1425 1430 1435 1440
 Val Gln Pro Ser Asn Pro Ala Pro Asp Thr Ala Glu Glu Thr Arg Ala
 1445 1450 1455
 Arg Trp Thr Arg Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Lys Thr Tyr Gly Leu Asp
 1460 1465 1470
 Phe Glu Val Pro Phe Glu Ile Leu Asp Thr Ile Gly Glu Asp Gly Met
 1475 1480 1485
 Leu Ser Met Met Thr Asp Phe Leu Ala Asn Thr Asp Ala Ser Glu His
 1490 1495 1500
 Gly Leu Ser Ala Gly Val Leu Glu His Gln Arg Ala Ser Phe Val Asp
 1505 1510 1515 1520
 Asn Arg Ile Leu Ala Lys Leu Asn Phe Ala Asp Trp Ala Asn Val Glu
 1525 1530 1535
 Ala Pro Val Ile Leu Phe Arg Ala Glu Arg Met His Asp Gly Ala Ile
 1540 1545 1550
 Glu Leu Glu Pro Asn Tyr Ala Lys Ile Asp Gln Asp Gly Gly Trp Ser
 1555 1560 1565
 Gly Ile Val Asn Asp Leu Glu Ile Val Gln Leu Asn Gly Asp His Leu
 1570 1575 1580
 Ala Val Val Asp Glu Pro Glu Ile Gly Thr Val Gly Ala His Leu Ser
 1585 1590 1595 1600
 Arg Arg Ile Asp Glu Ile Ser Arg Lys Asn
 1605 1610

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR pks13a

<400> 3
 gctggarctv acvtgggarg c



<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR pks13b

<400> 4
 gtgsgcgttg gydccraavc cgaa

24

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR 13Rtb

<400> 5
 gaggacatat ggctgacgta gcggaatc

28

<210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR 13Stb

<400> 6
 cgggtgaaagc ttctgcttgc ctacctcact tg

32

<210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR 13Ttb

<400> 7
 gctcggggat cctcactgct tgectaccte ac

32

<400> 8
aatatgacta gtagccaatc gtcggatcag aag 33

<210> 9
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13Dcg

<400> 9
agctctagat ctctaattct tccgagaaat ctcat 35

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR pkde15

<400> 10
gaaatctcga gccacggcga aa 22

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR pkde12

<400> 11
acgattgccg cggttccata ttg 23

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR pkde13

<400> 12
catcctgttc cgcggaacgc atgc 24

<210> 13
<211> 23
<212> DNA



<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR pkde14

<400> 13

cagcatgatg gagatctgag ggc

23

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR fa2

<400> 14

tctgaccacc ttccgtgaag c

21

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR ac2

<400> 15

gaacgagttc agagcttc

18

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR K10

<400> 16

tatttcgaat gggtcgctgg gtttatc

27

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR pk1

<400> 18
 gccgtgacgg tatctcgg 18

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR pk2

<400> 19
 ccagggcagt tgcttcaatg 20

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR pk3

<400> 20
 tccggaaga tctcacgccg cg 22

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR pk4

<400> 21
 gcgtgcgcgc agatctgcta gc 22

<210> 22
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR 13F

<400> 22
gctctagagt tttaaagctg gacctgtcca acgtcaagg

39

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13G

<400> 23
ggactagtcg tcgaaaccga ccgtcaccag

30

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13H

<400> 24
ggactagtcg gcatcttcaa cgagttgc

28

<210> 25
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13I

<400> 25
cccaagcttg tttaaacttg tcgaagtggg tcgacgg

37

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13J

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13K

<400> 27

cacgatcgag tcgagctcga

20

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR H1

<400> 28

agcaccagcg gttcgccgt

19

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR H2

<400> 29

tgcacgactt cgaggtgttc g

21

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13R

<400> 30

atgagatctg atgaaaacca cagcgat

27

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13P

<400> 31

ggactagtct tggcgacggc cttctcac

28



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

09 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/112
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0310 470
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
UTILISATION DE LA PROTEINE Pks 13 CODANT POUR LA CONDENSASE DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3, rue Michel Ange - 75016 PARIS		
UNIVERSITE PARIS SUD XI - 15 rue Georges Clémenceau - 91405 ORSAY Cedex		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		GUILHOT
Prénoms		Christophe
Adresse	Rue	11 rue Jean François de la Pérouse
	Code postal et ville	31160 MURET
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		DAFFE
Prénoms		Mamadou
Adresse	Rue	50 allée Henri Sallier
	Code postal et ville	31140 TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		HOUSSIN
Prénoms		Christine
Adresse	Rue	23 rue Michelet
	Code postal et ville	92317 CHAVILLE
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utiliser plusieurs formulaires. Indiquer en haut à droite le N° de la page suiv. du nombre de pages.		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/112
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0310430
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
UTILISATION DE LA PROTEINE Pks 13 CODANT POUR LA CONDENSASE DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3, rue Michel Ange -75016 PARIS		
UNIVERSITE PARIS SUD XI - 15 rue Georges Clémenceau - 91405 ORSAY Cedex		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	PORTEVIN
	Prénoms	Damien
Adresse	Rue	135 Avenue de Lespinet Résidence King, Apt 47
	Code postal et ville	31140 TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	DE SOUSA
	Prénoms	Célia
Adresse	Rue	49 rue de Montjay
	Code postal et ville	91140 ORSAY
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 4 septembre 2003 VIALLE-PRESLES Marie José		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.